

Micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, con fines de conservación genética

Micropropagation of Phragmipedium kovachii, for genetic conservation purposes

Ruiz Sánchez, María Emilia¹[\[0000-0002-9933-9017\]](https://orcid.org/0000-0002-9933-9017)

¹Universidad Nacional San Martín, Tarapoto, Perú
meruiz@unsm.edu.pe

Resumen. Se estableció un protocolo de micro propagación de *Phragmipedium kovachii*, con fines de conservación, se evaluó la germinación y el efecto de auxinas y citoquininas durante las fases de multiplicación de protocormos y enraizamiento de plántulas de *Phragmipedium kovachii*. La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias en la Universidad Nacional de San Martín. La semilla de *Phragmipedium kovachii*, procedió de la zona del Alto Mayo, se evaluó el porcentaje de germinación según (Gálvez, 2005), con pH modificado a 7. Para la multiplicación y enraizamiento, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas con 4 tratamientos, 5 repeticiones y 5 protocormos (fase de multiplicación), y 4 tratamientos con 5 repeticiones y 10 plántulas (fase de enraizamiento). Los resultados mostraron una germinación de 60,48% y en la fase de multiplicación, en los primeros días, los protocormos mostraron un color Verde (V) en todos los tratamientos, pero fue cambiando con el tiempo, al color marrón (fenolizada) (F). Según la Prueba de Tukey ($P < 0,01$), en los indicadores número de hojas por protocormo, tasa de crecimiento y longitud de protocormo, el T3 fue el más significativo. En la fase de enraizamiento, la prueba de Tukey ($P < 0,01$), para altura de plántulas (cm), número de raíces/plántula y longitud de raíces/plántula, se observó que los tratamientos estadísticamente no difieren entre sí. Concluyendo que, el protocolo utilizado es apropiado para propagar plántulas de *Phragmipedium kovachii* en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: auxinas, citoquininas, micropropagación, orquídea, phragmipedium

Abstract. We established a micropropagation protocol of *Phragmipedium kovachii*, for preservation, germination and the effect of auxins and cytokinins were evaluated during the multiplication phases of protoorms and rooting of seedlings of *Phragmipedium kovachii*. The research was conducted in the Plant Tissue Cultivation Laboratory (LCTV) of the Faculty of Agricultural Sciences at the National University of San Martín - Tarapoto. The seed of *Phragmipedium kovachii*, was from the Alto Mayo area, the percentage of seed germination was evaluated (Galvez, 2005), with pH modified to 7. For multiplication and rooting tests, a Design was used Completely Random (DCA), with different concentrations of auxins and cytokinins with 4 treatments, 5 repetitions and 5 protoorms (multiplication phase), and 4 treatments with 5 repetitions and 10 seedlings (phase rooting). The results showed a germination percentage of 60,48%, in addition; in the multiplication phase, in the first days the color in the protoorms was green (V) in all the treatments, but it was changing according to the time, until the brown coloration (phenolized) (F) became dominant. According to the Tukey Test ($P < 0,01$), in the indicators number of leaves per proto-form, growth rate and length of proto-form, T3 was the most significant. In the rooting phase, the Tukey test ($P < 0,01$), in the indicators seedling height (cm), number of roots/seedling and length of roots/seedling, it was obtained that the treatments do not differ from each other statistically. Concluding that, the protocol used is appropriate to propagate seedlings of *Phragmipedium kovachii* under *in vitro* conditions.

Keywords: auxins, cytokinins, micropropagation, orchis, phragmipedium

Citar como: Ruiz Sánchez, M. E. (2021). Micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, con fines de conservación genética. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 1(1), 45-61. <https://doi.org/10.51252/raa.v1i1.99>

Recibido: 15/11/2020

Revisado: 15/12/2020

Publicado: 31/01/2021

1 Introducción

La familia Orchidaceae cuenta con una gran diversidad genética, a nivel mundial se conocen cerca de 30 000 especies, de las cuales en el Perú hay aproximadamente 3 000. Esta riqueza de especies contrasta con su alta vulnerabilidad a la presión antrópica por efectos de la extracción selectiva y los cambios en el hábitat asociado a las poblaciones naturales. Las orquídeas son uno de los grupos de plantas más apreciados en el comercio internacional de especies ornamentales y debido a su diversidad, colores, formas y rareza, hay muchas personas interesadas en su investigación, cultivo y colección (MINAM, 2017).

Estas especies son vulnerables a los cambios ambientales, debido a su alto grado de asociación a microambientes específicos (Krömer *et al.*, 2007, citado por Benavente *et al.*, 2020). La explotación de especies para su comercialización, ha ocasionado una fuerte presión de extracción, debido a la demanda del comercio nacional e internacional, poniendo en peligro a muchas especies. Como resultado, todas las orquídeas están incluidas en la lista CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre), donde se registra a las especies cuyo comercio debe ser regulado para prevenir su extinción (MINAM, 2015).

Las orquídeas forman semillas diminutas parecidas al polvo que son fácilmente dispersadas por el viento por lo que no pueden almacenar nutrientes en el embrión y a menudo dependen de los hongos (predominantemente *Rhizoctonia spp.*) para la germinación de las semillas (Arditti & Ghani 2000, Brundrett *et al.*, 2003 y Rasmussen 1995, citados en Ritmejerjtyé *et al.*, 2018). El hecho de que las semillas sean de tamaño pequeño y de endosperma reducido, dificulta el proceso de germinación (Pereira *et al.*, 2005, citado por Gonçalves *et al.*, 2016).

Sin embargo, la germinación simbiótica no es necesaria si las semillas son traspasadas a un medio estéril provisto de nutrientes y una fuente de carbono (Gonçalves *et al.* 2016). Salgado *et al.*, (2019) indica que, Knudson reporto en el año de 1922 que las semillas de orquídeas son capaces de germinar asimbióticamente, *in vitro*, incrementando enormemente las posibilidades de aumentar la población. La técnica *in vitro* de germinación asimbiótica de semillas puede servir para satisfacer la demanda de la industria de la floricultura, así como para fines de conservación.

El cultivo de tejidos vegetales permite la conservación de material vegetal en condiciones *in vitro* como una alternativa útil de conservación *ex situ* (Tapia y Figueroa *et al.*, 2017). Sin embargo, se debe tener en cuenta que, el conjunto de factores (medio de cultivo, estado de madurez, calidad de semillas, relacionada directamente con la viabilidad) pueden tener una incidencia particular para cada especie (Pérez-Martínez y Castañeda-Garzón, 2016). Un medio de cultivo puede ser definido como “una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la

nutrición y manipulación de los cultivos in vitro” (Roca y Mroginski, 1993, citado por Mendoza, I. 2017).

La orquídea *Phragmipedium kovachii*. es una especie endémica del Perú únicamente con poblaciones registradas dentro del Bosque de Protección Alto Mayo. Es una especie declarada en peligro de extinción encontrándose registrada en el apéndice I y en la categorización nacional en el CR (Peligro Crítico) según el D.S. N° 043-2006-AG. Esta Orquídea se caracteriza por tener flores que alcanzan de 11 a 15 cm de ancho y porque en el labelo presenta una coloración blanca en su interior, lo que lo diferencia de otras especies afines (MINAM, 2017).

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) de la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto (UNSM-T), el cual, por 26 años, viene desarrollando y optimizando protocolos para propagar de manera *in vitro*, diferentes especies de orquídeas y otras especies vegetales.

Dado que en la actualidad existe poca o ninguna información sobre la micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, a pesar de ser una especie como todas las orquídeas difíciles de propagar y de estar en peligro de extinción como se mencionan en los párrafos anteriores, se decidió realizar investigación en la micropropagación de la orquídea *Phragmipedium kovachii*, con fines de su conservación genética.

Se tuvo como objetivo general determinar un protocolo de micropropagación de la orquídea *Phragmipedium kovachii*, con fines de conservación genética, para lo cual se consideraron dos objetivos específicos el de determinar un protocolo para el establecimiento de semilla in vitro de *Phragmipedium kovachii*, y el de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Auxina y Citoquinina en las fases de multiplicación de protocormos y enraizamiento de plántulas *Phragmipedium kovachii*.

Finalmente se logró determinar que el protocolo evaluado en las diferentes fases de la micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, sí es el apropiado para el cultivo in vitro esta especie. De esta manera se está aportando a su conservación genética y a la investigación científica de esta especie en peligro de extinción.

2 Materiales y métodos

2.1 Diseño

Se establecieron dos experimentos: fase de multiplicación de protocormos y fase de enraizamiento de plántulas de *Phragmipedium kovachii*. Para cada uno se estableció un Diseño Completamente al Azar (DCA), utilizando 3 tratamientos y un testigo (evaluando concentraciones de citoquininas y auxinas) con 5 repeticiones por tratamiento para la fase de multiplicación (Tabla 1), y 10 repeticiones por tratamiento para la fase de enraizamiento de plántulas (Tabla 2). Los datos

Citar como: Ruiz Sánchez, M. E. (2021). Micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, con fines de conservación genética. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 1(1), 45-61.
<https://doi.org/10.51252/raa.v1i1.99>

obtenidos fueron procesados y analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), y una comparación de medias mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 1%.

Tabla 1

Diseño de investigación del primer experimento (fase de multiplicación).

Tratamientos	Auxina mg/l	Citoquinina mg/l	Repeticiones
T0	0,00	0,00	5
T1	0,25	2,50	5
T2	0,50	5,00	5
T3	0,75	7,50	5

Tabla 2

Diseño de investigación del segundo experimento (fase de enraizamiento).

Tratamientos	Auxina mg/l	Repeticiones
T0	0,00	10
T1	0,50	10
T2	0,75	10
T3	1,00	10

2.2 Ámbito y periodo de estudio

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) en la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto (UNSM – T), ubicado en el distrito de Morales, provincia de San Martín, región de San Martín, a una Latitud sur: 6°36'15"; Longitud oeste: 76°10'30" y Altitud de 283 m.s.n.m., durante los meses de mayo a diciembre del año 2017.

2.3 Procedimiento

Obtención de la Semilla de *Phragmipedium kovachii*. La semilla de *Phragmipedium kovachii*, (Figura 1), se obtuvo del Instituto de Investigación Biológica de las Cordilleras Orientales (INIBICO), quien cuenta con la autorización del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) para cultivar y manejar esta especie considerada en peligro de extinción.

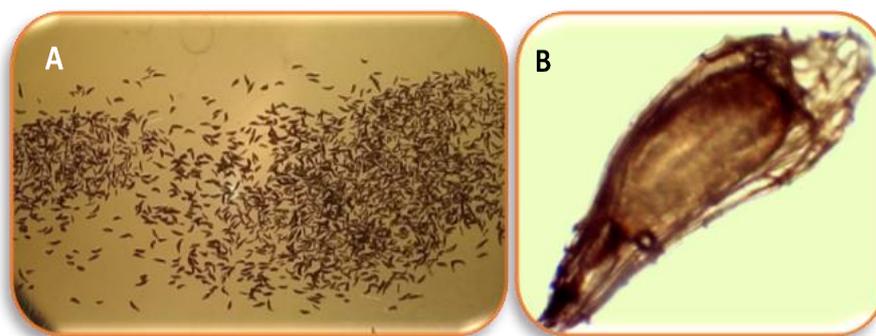


Figura 1: Semillas de la orquídea *Phragmipedium kovachii*. A) Vista en conjunto de las semillas. Aumento 10X. B) Vista individual de la semilla. Aumento 40X.

Desinfección de las semillas. Se realizó mediante el método de la jeringa con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (NaOCl), el procedimiento se desarrolló en una cámara de flujo laminar en el área de siembras y transferencias del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la FCA/UNSM-T. Los materiales utilizados fueron los siguiente: jeringas de 20 ml, algodón, pinzas, bisturí, mango de bisturí, mechero, cámara de flujo laminar, solución de hipoclorito de sodio (0,5%), semillas de *Phragmipedium kovachii.*, alcohol, frascos de vidrio, los que se muestran en la (Figura 2A) (Gálvez, 2005). La desinfección se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se colocó algodón en su interior y presionar bien, hasta que el algodón quedó completamente compacto. Se colocaron las semillas, dentro de la jeringa, sobre el algodón compactado (Figura 2B).
- Se preparó una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Se sumergió la jeringa con las semillas en la solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, (Figura 2C), por 15 minutos, luego se absorbió la solución con la jeringa con las semillas dentro, agitando por unos minutos y se expulsó la solución y se enjuagó con agua destilada estéril, se repitió por tres veces y por un tiempo total aproximado de 15 minutos (Figura 2D).
- Se expulsó toda la parte líquida y se extrajeron las semillas, para su posterior siembra.

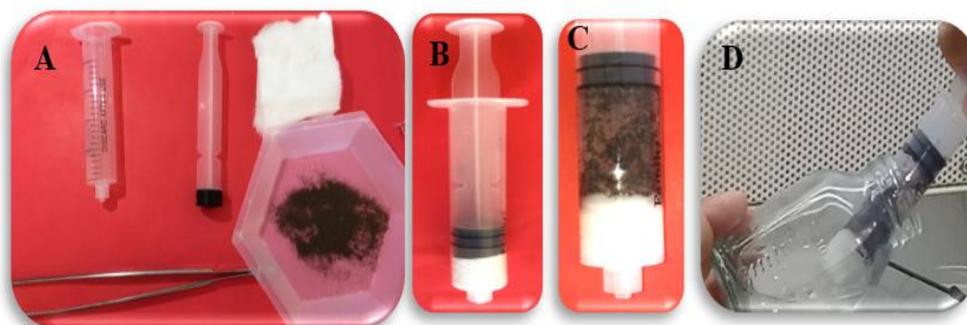


Figura 2: Desinfección de semillas de *Phragmipedium kovachii.*; (A) materiales utilizados (jeringa, algodón, pinza, semillas); (B) jeringa con algodón compactado y con las semillas dentro; (C) jeringa con la solución desinfectante; (D) desinfección y enjuague de semillas.

Establecimiento *in vitro* de semillas de *Phragmipedium kovachii.* Con la ayuda de un bisturí y mechero (Figura 3A), se cortó la base de la jeringa que contenía a las semillas desinfectadas (Figura 3B), para extraerlas con una pinza y colocarlas en una placa Petri estéril (Figura 3C). Se sembró las semillas con una espátula, colocándolas en tubos de ensayo que contenían medios de cultivo (Figura 3D), se taparon los tubos con su respectiva tapa y se los selló con cinta para evitar la contaminación (Figura 3E). El medio de cultivo que se utilizó fue el medio M&S modificado utilizado por Gálvez (2005), con pH modificado a 7. Finalmente se rotularon los tubos, y se llevaron al área de incubación a una temperatura, humedad relativa y Luz controlados. Se cubrieron

los tubos con papel aluminio con la finalidad de brindarles oscuridad (Figura 3F), que es un requerimiento de *Phragmipedium kovachii*, según Gálvez (2005), para que las semillas puedan germinar.

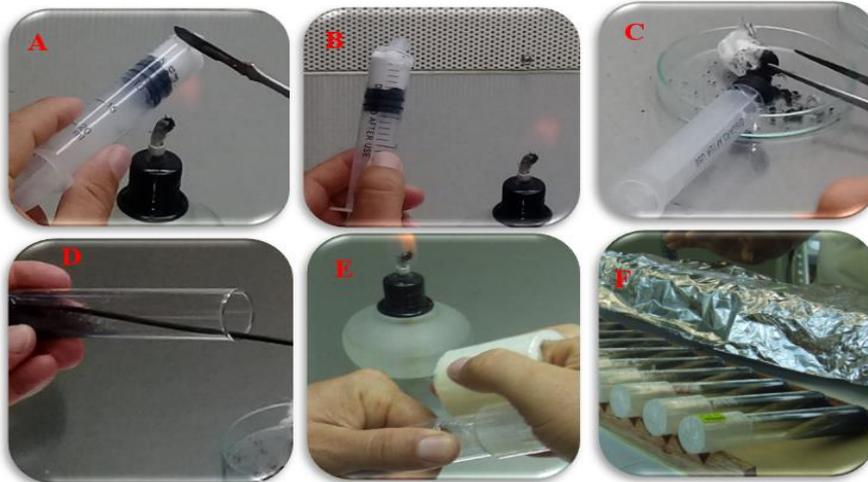


Figura 3: Siembra *in vitro* de semillas de *Phragmipedium kovachii*, (A) cortando la base de la jeringa; (B) jeringa cortada; (C) extracción de semillas; (D) siembra de las semillas en tubo de ensayo; (E) tapado y sellado de tubos; (F) tubos de ensayo con semillas sembradas.

2.4 Sistema de variables

Porcentaje de viabilidad óptica de la semilla. Se tomaron 10 grupos de semilla, que fueron observados con la ayuda del estereoscopio, en cada observación se tuvo en cuenta el número de semillas con embrión y el número de semillas sin embrión, (las semillas con embrión fueron contadas como viables y las semillas sin embrión, como no viables), luego se calculó el porcentaje en base al total de semillas de cada muestra.

Porcentaje de germinación de la semilla. Se observó la germinación, tomando un total de 10 muestras al azar (aproximadamente 20 semillas por muestra), y se obtuvo el promedio de germinación total (Figura 4).

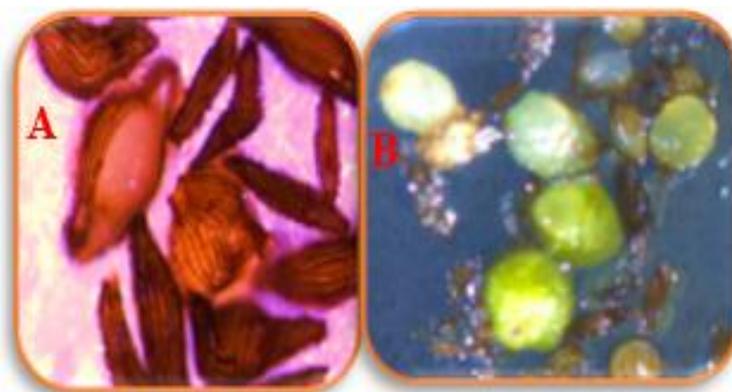


Figura 4: Germinación de la semilla de *Phragmipedium kovachii*. (A) semillas abultadas y con ruptura de testa; (B) semillas sin testa (color blanco) y protocormos (color verde)

Efecto de auxina (ANA) y citoquinina (BAP) durante las etapas de la micro propagación de *Phragmipedium kovachii*. Se realizaron evaluaciones en dos fases de la propagación de orquídeas, en la fase multiplicación de protocormos, en donde observo la coloración de protocormos, número de hojas y altura o longitud de protocormos y en la fase de enraizamiento de plántulas, en donde se evaluó el número de hojas, altura de plántulas, número de raíces y longitud de raíces.

Fase de multiplicación de protocormos de *Phragmipedium kovachii*. Consistió en evaluar primeramente la coloración de protocormos, mediante dos criterios de evaluación: Verde (protocormo de color verde) y Fenolizado (protocormo color marrón), además, se evaluó el número de hojas por protocormo, contando el número de hojas por unidad experimental, y la longitud de protocormos, midiendo con una regla centimetrada desde la base del protocormo hasta el ápice de la última hoja, todas estas evaluaciones fueron realizadas cada quince días durante seis fechas de evaluación.

Fase de enraizamiento de plántulas de *Phragmipedium kovachii*. Se evaluó el número de hojas por plántula, mediante la contabilización del número de hojas por plántula, además se evaluó la altura de plántulas, con una regla centimetrada, el número de raíces por plántula, se contó individualmente por plántula y la longitud de raíces, se midió con una regla y una linterna para observar a trasluz, para obtener una mejor validez de los datos, ya que el color oscuro del medio de cultivo dificultaba la observación, todas las evaluaciones se realizaron cada quince días durante seis fechas, obteniéndose un promedio por cada tratamiento evaluado.

2.5 Análisis estadístico

Todos los datos fueron tabulados en hojas de cálculo Excel, siendo procesados y analizados mediante un análisis de varianza (ANVA), y un test de comparación de medias (Tukey, $P < 0,05$). Para realizar este análisis se utilizó el paquete estadístico InfoStat (version 2012e; Córdoba, Argentina).

3 Resultados y discusiones

3.1 Porcentaje de viabilidad óptica de semillas de *Phragmipedium kovachii*.

En la Tabla 3 se puede observar que el porcentaje de viabilidad de la semilla supera al 60% en promedio en todas las muestras observadas.

Tabla 3
*Porcentaje de Viabilidad óptica de semillas de *Phragmipedium kovachii*.*

Muestras	% Viabilidad
M1	60,00
M2	53,33
M3	60,00
M4	64,71
M5	61,36
M6	60,53
M7	51,61
M8	62,50

Citar como: Ruiz Sánchez, M. E. (2021). Micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, con fines de conservación genética. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 1(1), 45-61.
<https://doi.org/10.51252/raa.v1i1.99>

M9	62,50
M10	78,13
Promedio	61,47

Según los resultados, se obtuvo un porcentaje promedio de 61,47 de viabilidad, lo que supero a los resultados obtenidos por Gálvez (2005), quien obtuvo 35,6% en sus evaluaciones, esta diferencia se asume que se debe a factores que tienen que ver con el material genético vegetal (semillas), como el tiempo de maduración de la semilla, tiempo a la cosecha, tiempo de almacenamiento, etc. Con respecto a esta especie todavía no hay más información. Mientras que Duarte *et al.* (2017) encontró que en la orquídea *Phaius tankervilleae* varía entre 17,45 y 33,30% respectivamente e indica que la diferencia se debe al tamaño de los frutos o capsulas de la orquídea.

3.2 Porcentaje de germinación de semilla de *Phragmipedium kovachii*.

La Tabla 4 muestra el porcentaje de germinación de semillas, quien fue mayor al 50% en todas las muestras observadas.

Tabla 4
Porcentaje de germinación de semillas de Phragmipedium kovachii.

Muestras	% Germinación*
M1	52,50
M2	59,73
M3	55,04
M4	60,70
M5	63,12
M6	63,10
M7	61,20
M8	66,50
M9	64,31
M10	58,60
Promedio	60,48

*% de germinación: es el promedio general de las cuatro pruebas que se realizaron

Según los resultados obtenidos en donde se evaluó el porcentaje de germinación de semillas de *Phragmipedium kovachii*, se observó un porcentaje promedio de germinación de 60,48%, superando al resultado obtenido por Gálvez (2005), que fue de 25,4% de germinación, lo que indica que el protocolo y el medio de cultivo utilizado son eficientes. Se asume que la diferencia existente se debe a la variación en el pH modificado, mientras que Gálvez (2005) utilizo un pH de 5,1 a 5,4, en el presente trabajo de investigación se utilizó un pH de 7,0. Lo que es corroborado por Thompson, (1980), quien indica que el nivel de pH es también importante ya que la mayoría de orquídeas germinan en un medio de pH 5,5. Sin embargo, existen especies andinas prefieren niveles más altos de pH, 5,6 al 5,9.

Sin embargo, Banda-Sánchez *et al.* (2017) muestran que en *Prosthechea* obtuvo 29 % de semillas germinadas y afirma que la diferencia puede deberse a la maduración del fruto. Quien está de acuerdo con Pérez-Martínez *et al.*, (2016) que afirman que la germinación de semillas de

orquídeas cultivadas in vitro a partir de cápsulas, varía dependiendo de su madurez, de la calidad de las semillas y del tipo de orquídea.

Asimismo, Kunakhonnuruk *et al.* (2018) aseguran que el éxito de germinación de la semilla in vitro depende del grado de madurez de la semilla y además dicen que también depende del tipo de polinización del fruto. Esto hace ver que sí es posible la propagación in vitro de orquídeas entre ellas *Phragmipedium kovachii*. a partir semillas lo que concuerda con MINAM (2013) quien menciona que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semilla mediante el cultivo in vitro. También se puede ver que para tener éxito en la germinación asimbiótica de orquídeas dependerá de muchos factores tanto extrínsecos e intrínsecos de cada especie de orquídea, por lo que es muy necesario realizar trabajos de investigación en cada una de las especies.

3.2. Fase de multiplicación de protocormos de *Phragmipedium kovachii*.

Coloración de protocormos. Se evaluó los cambios de coloración durante seis (Tabla 5).

Tabla 5
Porcentaje de incidencia de coloración de protocormos durante seis fechas de evaluación.

Ttos	Fecha 1			Fecha 2			Fecha 3		
	% V	% F	D	% V	% F	D	% V	% F	D
T0	64	36	V	56	44	V	64	36	V
T1	76	24	V	60	40	V	60	40	V
T2	80	20	V	80	20	V	84	16	V
T3	76	24	V	80	20	V	84	16	V
Ttos	Fecha 4			Fecha 5			Fecha 6		
	% V	% F	D	% V	% F	D	% V	% F	D
T0	40	60	F	32	68	F	20	80	F
T1	24	76	F	4	96	F	0	100	F
T2	64	36	V	32	68	F	8	92	F
T3	60	40	V	48	52	F	20	80	F

*(D): Dominancia: V (Verde); F (Fenolizado).

Se observó que en los primeros días de evaluación la dominancia del color de protocormos es Verde (V) en todos los tratamientos; pero esto va cambiando según van pasando los días hasta llegar a ser dominante la coloración marrón (Fenolizada) (F). En cuanto a los protocormos, Vargas (2012), menciona que los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento.

Sin embargo, Gálvez (2005), en su trabajo de investigación indica que después de 2 semanas de la siembra observó que sufrieron problema de fenolización o muerte (color marrón), menciona que esto se debe al tiempo transcurrido de repique, ya que es necesario el reemplazo del medio de cultivo cada cierto tiempo (30 días), Rodríguez (1999), citado por Gálvez (2005) indica que, es necesario realizar repique cada 30 días, para evitar fenalizaciones, porque algunas especies contienen sustancias endógenas que exudan la superficie, lo que se puede evitar utilizando

antioxidantes, además si la humedad relativa es muy baja, durante el periodo de cultivo se puede presentar deshidratación del medio y aumentar la salinidad.

Asimismo, en el presente trabajo se observó que el T0 (0 ml de ANA) presentó el más alto porcentaje de protocormos fenolizados (F) o muertos, esto concuerda con Gil & Gutiérrez (2016) quienes indican que obtuvieron resultados que mostraron que el medio de cultivo sin la adición de ANA (0 mg/l-1) se presentó el mayor porcentaje de muerte de protocormos, sin embargo reconocen que la adición de ANA en el medio de cultivo *in vitro* para generación de protocormos y establecimiento de plántulas de *Prosthechea sp.* obtuvo resultados diferenciales por lo que es necesario realizar estudios exhaustivos para implementar su utilización en la micropropagación de esta especie de orquídea.

Número de hojas por protocormo. La Figura 5 muestra la prueba de Tukey ($P < 0,01$) respectivamente para el número de hojas por protocormo, datos transformados a Raíz cuadrada (x).

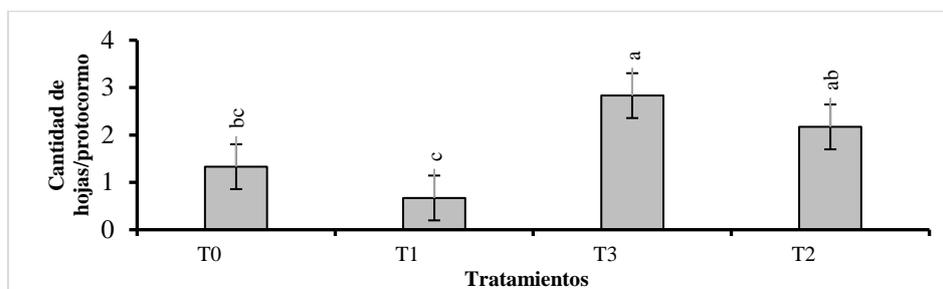


Figura 5. Prueba de Tukey ($P < 0,01$), para el número de hojas por protocormo de *Phragmipedium kovachii*, considerando el promedio general de las seis fechas de evaluación (cada quince días), donde las letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

El análisis de comparación de medias de Tukey ($P < 0,01$) (Figura 5) para el número de hojas por protocormo de plántulas de *Phragmipedium kovachii*, muestra que el tratamiento T3 es el más sobresaliente de los tratamientos, presentando 3 hojas por protocormo, seguido del tratamiento T2 con 2 hojas por protocormo, en los demás tratamientos no se encontró diferencias estadísticas significativas, siendo, además, el T0 con 1 hoja, el que obtuvo el menor valor para esta variable.

Los resultados obtenidos difieren con los obtenidos por Gálvez (2005), quien menciona que obtuvo poca diferencia entre tratamientos, en lo que respecta a número de hojas, e indica que posiblemente el factor determinante para la formación de brotes (desarrollo de hojas) y formación de raicillas sea la incorporación de BAP y ANA a los medios de cultivo empleados ya que ambos interactúan, aparte incluyendo otros reguladores de crecimiento que son sintetizados por los protocormos, como lo sostiene Arditti (1990), que menciona que las auxinas (ANA) y citoquininas (BAP) actúan directamente en el desarrollo de las plántulas, hojas e induce la salida de raíces, gracias a que las hormonas actúan en los procesos fisiológicos y metabólicos específicos dentro

de un órgano, siempre con la ayuda de las condiciones ambientales brindadas en la cámara de incubación.

Longitud de protocormo. La Figura 6 muestra la prueba de Tukey ($P < 0,01$) respectivamente para longitud de protocormo de *Phragmipedium kovachii*, datos transformados a Raíz cuadrada (x).

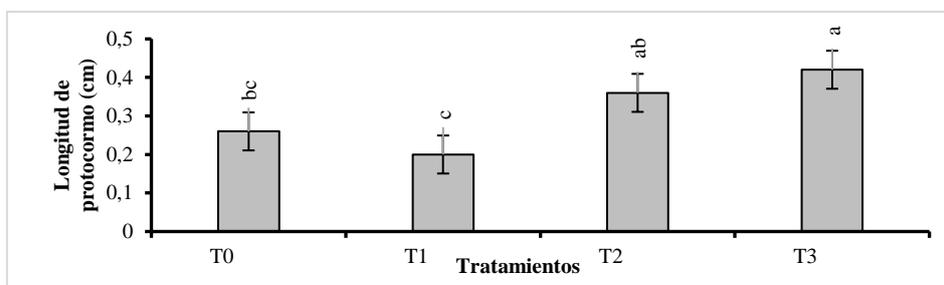


Figura 6. Prueba de Tukey ($P < 0,01$), para la longitud de protocormo (cm) de *Phragmipedium kovachii*, considerando el promedio general de las seis fechas de evaluación (cada quince días), donde las letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

El análisis de comparación de medias de Tukey ($P < 0,01$) (Figura 6) para la longitud de protocormo de *Phragmipedium kovachii*, muestra que el tratamiento T3 es el más sobresaliente de los tratamientos, presentando 0,42 cm de longitud de protocormo, seguido del tratamiento T2 con 0,36 cm de longitud de protocormo, en los demás tratamientos no se encontró diferencias estadísticas significativas, siendo, además, el T0 con 0,26 cm de longitud, el que obtuvo el menor valor para esta variable.

Arditti (1982), menciona que existe diferentes medios para especies de orquídeas, donde incluye en su composición reguladores de crecimiento como son hormonas (en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico), tales como auxinas, citoquinas, giberelinas, vitaminas (biotina) que actúan sobre los vegetales, algunos actúan en forma rápida, otros lo hacen menos rápido y otros impiden el normal desarrollo de la planta; así mismo, Arditti (1990), menciona que las *combinaciones* de auxinas y citoquininas puede favorecer el mejor desarrollo de las plántulas, induciendo la formación de raíces, siempre y cuando el medio donde que se emplea permita que interactúen los componentes, como también las condiciones ambientales brindadas sean las adecuadas.

3.3 Fase de enraizamiento de plántulas de *Phragmipedium kovachii*

Número de hojas por plántula. La Figura 7 muestra la prueba de Tukey ($P < 0,01$) respectivamente para el número de hojas por plántula de *Phragmipedium kovachii*, datos transformados a Raíz cuadrada (x).

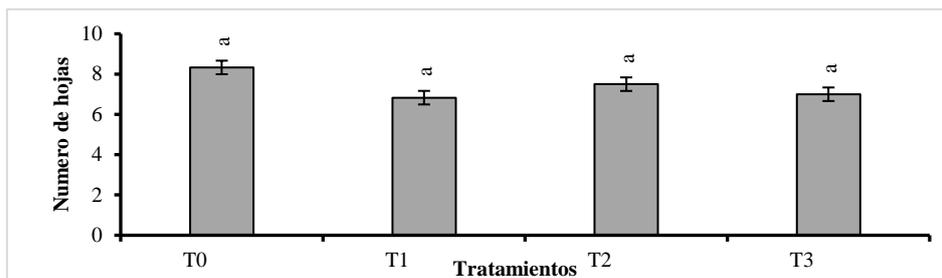


Figura 7: Prueba de Tukey ($P<0,01$), para el número de hojas por plántula de *Phragmipedium kovachii*., considerando el promedio general de las seis fechas de evaluación (cada quince días), donde las letras iguales no difieren estadísticamente entre sí.

El análisis de comparación de medias de Tukey ($P<0,01$) (Figura 7) para el número de hojas por plántula de *Phragmipedium kovachii*., muestra que no se encontró diferencias estadísticas significativas entre sí. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cazarez et al. (2016), quienes indican que al agregar BAP y ANA al medio de cultivo para multiplicar orquídeas, observaron que para las variables número de hojas y raíces no se existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, Gálvez (2005), afirma que, en su trabajo, la adición de ANA fue lo que permitió un mayor desarrollo y permitió la salida de raíces.

Altura de plántula. La Figura 8 muestra la prueba de Tukey ($P<0,01$) respectivamente para la altura de plántulas de *Phragmipedium kovachii*, datos transformados a Raíz cuadrada (x).

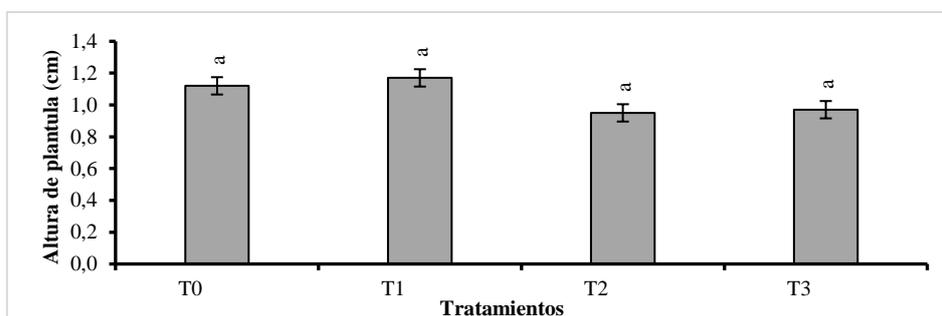


Figura 8: Prueba de Tukey ($P<0,01$), para la altura de plántulas de *Phragmipedium kovachii*, considerando el promedio general de las seis fechas de evaluación (cada quince días), donde las letras iguales no difieren estadísticamente entre sí.

El análisis de comparación de medias de Tukey ($P<0,01$) (Figura 8) para la altura de plántulas de *Phragmipedium kovachii*, muestra que no se encontró diferencias estadísticas significativas entre sí.

Esto indica que no se requieren altas concentraciones de auxinas para el crecimiento y desarrollo de las plántulas de orquídeas, más bien se requiere tener en cuenta otros factores como la madurez de la semilla y el medio de cultivo que presente otros elementos disponibles para la absorción por las semillas; esto se corrobora con lo que dice Muñoz (2011) que en la especie de orquídea *Epidendrum jameisonic*, consiguió incrementar el crecimiento de las plántulas con la utilización de cápsulas verdes y con la utilización del medio de cultivo compuesto por Murashigue & Skook $\frac{1}{4}$ + carbón activado 8 g/l.

Citar como: Ruiz Sánchez, M. E. (2021). Micropropagación de *Phragmipedium kovachii*, con fines de conservación genética. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 1(1), 45-61.
<https://doi.org/10.51252/raa.v1i1.99>

Número de raíces por plántula. La Figura 9 muestra la prueba de Tukey ($P < 0,01$) respectivamente para el número de raíces por plántula de *Phragmipedium kovachii*, datos transformados a Raíz cuadrada (x).

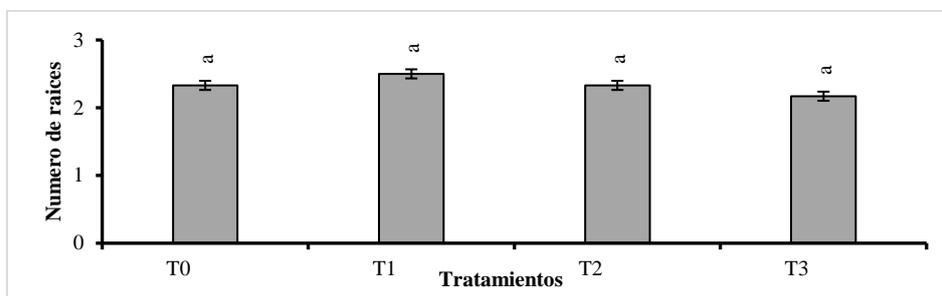


Figura 9. Prueba de Tukey ($P < 0,01$), para el número de raíces por plántula de *Phragmipedium kovachii*, considerando el promedio general de las seis fechas de evaluación (cada quince días), donde las letras iguales no difieren estadísticamente entre sí.

El análisis de comparación de medias de Tukey ($P < 0,01$) (Figura 9) para el número de raíces por plántula de *Phragmipedium kovachii*, muestra que no se encontró diferencias estadísticas significativas entre sí.

Los resultados obtenidos indican que las hormonas auxinas no influyen en el incremento del número de las plántulas de *Phragmipedium kovachii*., lo que concuerda con lo que dice Muñoz (2011), que altas concentraciones de auxina inhibe el crecimiento de la raíz, más bien indica que la riboflavina (B2) es necesaria para el crecimiento de la raíz y funciona reduciendo la cantidad de auxina del sistema radicular, además Parra y Nates-Parra (2007), quien reporta que las citoquininas también influyen inhibiendo el desarrollo de raíces laterales. En cambio, Cazarez et al., (2016) indican que en al adicionar auxinas y citoquininas al medio de cultivo para el número de hojas y raíces no se observaron diferencias significativas.

Longitud de raíces por plántula. La Figura 10 muestra la prueba de Tukey ($P < 0,01$) respectivamente para la longitud de raíces por plántula de *Phragmipedium kovachii*, datos transformados a Raíz cuadrada (x).

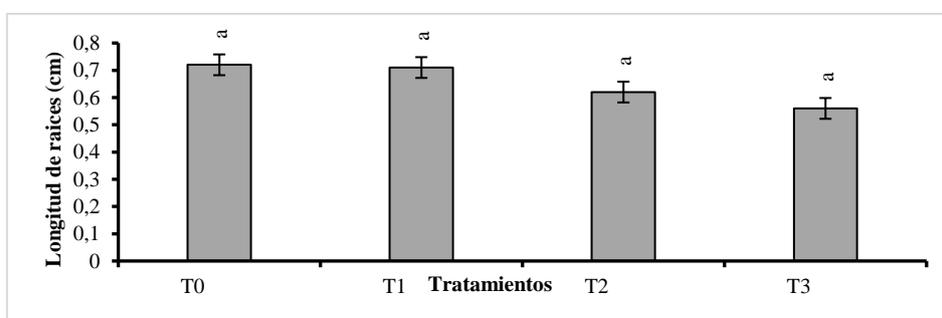


Figura 10: Prueba de Tukey ($P < 0,01$), para la longitud de raíces por plántula de *Phragmipedium kovachii*, considerando el promedio general de las seis fechas de evaluación (cada quince días), donde las letras iguales no difieren estadísticamente entre sí.

El análisis de comparación de medias de Tukey ($P < 0,01$) (Figura 10) para la longitud de raíces por plántula de *Phragmipedium kovachii*, muestra que no se encontró diferencias estadísticas significativas entre sí.

Todo lo observado hace ver que la auxina no incrementa la longitud de las raíces, más bien tal y como indica Muñoz (2011), la alta concentración de auxina inhibe el crecimiento de la raíz y menciona que la riboflavina (B2) es necesaria para el crecimiento de la raíz y funciona reduciendo la cantidad de auxina del sistema radicular. Chacón *et al.*, (2018) también indican que la adición de reguladores de crecimiento tales como ANA, BAP y KIN al medio MS mostraron ser esenciales para el crecimiento, desarrollo plantular de aspecto vigoroso y formación de raíces.

Así pues del presente estudio realizado se observa que hay mucho que investigar sobre la acción de las auxinas y citoquininas en el desarrollo del embrión y los protocormos en orquídeas tal y como afirma Yeung (2017) quien afirma que, aunque la acción precisa de las auxinas y citoquininas no está clara durante el desarrollo de la semilla y germinación, la información disponible indica que estas hormonas deben desempeñar un papel importante en la formación del embrión y de los protocormos, lo cual falta investigar más a fondo.

4 Conclusiones

Se validó un protocolo para la germinación de semillas de *Phragmipedium kovachii* bajo condiciones *in vitro*, utilizando un medio de cultivo propuesto por Gálvez (2005), con un pH modificado a 7,0; obteniendo un 60% de germinación.

En la fase de multiplicación se observó que a mayor concentración de auxinas y citoquininas mayor es la multiplicación de protocormos. En cambio, para la fase de multiplicación se observó que no existe diferencias entre los tratamientos evaluados en las diferentes etapas, lo que indica que las diferentes concentraciones de auxina (ANA), no hizo ningún efecto sobre las plántulas de *Phragmipedium kovachii*.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, Facultad de Ciencias Agrarias y al Instituto de Investigación y Desarrollo (IlyD) por el impulso a la investigación y por el financiamiento del presente proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, lugar en el cual se realizó el protocolo de multiplicación *in vitro* de *Phragmipedium kovachii* de la presente investigación.

Al Instituto de Investigación Biológica de las Cordilleras Orientales (INIBICO), quien nos proporcionó el material vegetal (semillas de *Phragmipedium kovachii*).

Referencias bibliográficas

- Arditti, J. (1982). *Orchid Biology: Reviews and Perspective II*. Cornell University, Ithaca, NY.
- Arditti, J. (1990). Lewis Knudson, his science, his times and his legacy. *Lindleyana* 5: 1-79.
- Banda-Sánchez, L., Pinzon – Ariza, Y.H. y Vanegas – Martinez, L.E. (2017). Características físicas y germinativas de semillas de la orquídea *Prosthechea sp.* de la zona andina, Fusagasugá, Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt" Bogotá, Colombia. *Revista Biota Colombiana*, 18 (1): pp. 80-87
- Benavente, L., Ocupa, L., Ugaz, A., Charcape, M. y Saldaña, I. (2020). CITES orchids of The Caserío El Hormiguero, El Carmen de la Frontera district, Huancabamba province, Piura region, Northwest of Peru. Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Piura. Piura. PERÚ. *Revista Arnaldoa*. 27 (1):pp 9-26.
- Cazarez, T. L., Graciano, J. J., Solís, s., Díaz, B., Nájera, J. A. y Montoya, J. B. (2016). Propagación in vitro de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango. México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Número 67: 19-25.
- Chacón Velasco, M. R., Contreras Acero, O. M. & Cáceres, H. E. (2018). Contribución a la conservación de orchidiaceas de Santander mediante cultivo in vitro de semillas. Barranquilla: Ediciones Universidad Simón Bolívar. Colombia. pp. 177.
- Duarte, R.E., Mangeón, V., Küppers, G., Rocha, P. y Niella, F. (2017). Tamaño y viabilidad de semillas: implicancias en la evolución y conservación de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT), Facultad de Ciencias Forestales (FCF)-Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Bertoni 124 Eldorado, Misiones 3380 Argentina. *Revista Caldasia* 39(2) pp 388-399.
- Gálvez, R. A. (2005). Desarrollo de protocolo para la propagación in vitro del *Phragmipedium kovachii* atwood, Dalstrom & Fernández (orchidaceae) a partir de semillas. Tesis Ing. Agrónomo. Tarapoto, Perú. Universidad Nacional de San Martin. 90 p.
- Gonçalves, L.de M., Machado, M.de F., Ballesta, P., Mora, F., Gutierre, M.A.M. y Mangolin, C.A. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo in vitro del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Roraima. Boa Vista, Roraima, Brasil. Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. *IDESIA (Chile)* Vol. 34 (1) pp 47-54.

- Gil, A., Contreras, D. & Gutiérrez, L. (2016). Establecimiento in vitro de protocormos de *Prosthechea sp.* bajo diferentes concentraciones de ácido naftalenacético. Universidad de Cundinamarca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Fusagasugá, Colombia. Mutis 6 (1) pp. 6-15.
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P. y Kongbangkerd, A. (2018). In vitro propagation of *Epipactis flava* Seidenf., an endangered rheophytic orchid: a first study on factors affecting asymbiotic seed germination, seedling development and greenhouse acclimatization. Plant Cell Tiss Organ Cult 135, 419–432 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1475-9>.
- Mendoza, I. (2017). Eficiencia de los medios nutritivos basales: sólido y líquido en la etapa de establecimiento in vitro de la orquídea “Tripita” *Trichopilia tortilis* Lindl. Producción Agropecuaria Y Desarrollo Sostenible, 5, 43-57. <https://doi.org/10.5377/payds.v5i0.5429>
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2017). Orquídeas del Perú y Herramientas para su Identificación. Ministerio del Ambiente. Primera edición. Lima. Perú. 92p.
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2015). Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial. Perú. Primera edición. 99 p.: Ilus. color.; mapas.; 584.4, ISBN 978-612-4174-19-3.
- Ministerio del Ambiente, (MINAM). (2013). Manual de orquídeas - Identificación y origen. Perú. Primera Edición. 39p.
- Muñoz, M. I. (2011). Evaluación de medios de cultivo para la germinación “in vitro” de las orquídeas *Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum jameisonic* Rchb.F., Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería Agronómica. 98p.
- Parra, A. & Nates-Parra, G. (2007). Variación de la comunidad de abejas de las orquídeas (Hymenoptera: Apidae) en tres ambientes perturbados del piedemonte llanero colombiano. Revista de biología tropical 55(3-4).
- Pérez-Martínez, B. y Castañeda-Garzón, S. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ. Subdirección Científica, Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. Bogotá DC. Colombia. Revista de Biotecnología Vegetal 16 (3): pp. 143 – 151.
- Ritmejeryté, E., Obvintseva, A. y Huynh, T. (2018). The effect of smoke derivatives and carbon utilisation on symbiotic germination of the endangered *pterostylis despectans* (orchidaceae). School of Applied Sciences, RMIT University, PO Box 71, Bundoora VIC 3083, Australia.
- Rodríguez, A. (1999). Orquídeas en Machu Picchu. EGEMSA. Cusco, Perú.

- Salgado, J. y Peñaranda, L. (2019). Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción in-vitro de orquídeas. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*. 6(1): 17-28
- Tapia y Figueroa, M., Carrión, A; Beraún, F. y Falcón, R. (2017). Micropropagación de orquídeas del género *Cattleya*. Instituto de Biotecnología UNALM. Perú. *Revista de ciencia, tecnología, arte y humanidades*. Vol.8(2):11-13.
- Thompson, P. 1980. *Orchids from seed*. Londres. HMSO. 175 p.
- Vargas, D. A. (2012). Establecimiento de un protocolo para el cultivo *in vitro* de semillas de *Cattleya violácea*. Guayaquil – Ecuador. Tesis título de Biólogo. Universidad de Guayaquil. 96 p.
- Yeung, E.C. (2017). A perspective on orchid seed and protocorm development. Department of Biological Sciences. University of Calgary. Canada. *Bot Stud* 58, 33